

Az európai angolna (*Anguilla anguilla*) ikrainkubációja során fellépő patogén *Vibrio* sp. azonosítása és az ellene való védekezés lehetőségeinek kidolgozása

Identification of a *Vibrio* sp. pathogenic for incubation of eggs of the European eel (*Anguilla anguilla*) and attempts to the treatment

Sellyei, B.^{1*}, Horváth, L.², Székely, Cs.¹, Boltizár, O.¹, Várkonyi, L.², Molnár, K.¹,
Kucharczyk, D.³, Jánosi, Sz.⁴, Bokor, Z.¹, Müller, T.^{1*}

¹ Magyar Tudományos Akadémia Állatorvos-tudományi Intézet, Budapest, 1143, Hungária krt. 21.

² Szent István Egyetem, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar, Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet, Halgazdálkodási Tanszék, Gödöllő, 2100, Páter Károly u. 1.

³ Department of Lake and River Fisheries, Faculty of Environmental Science, University of Warmia and Mazury in Olsztyn, Poland

⁴ Nemzeti Élelmiszerlánc-Biztonsági Hivatal, Állat-egészségügyi Diagnosztikai Igazgatóság, Bakteriológiai Laboratórium, Budapest, 1143 Tábornok u. 2.

*Elérhetőség: sellyei.boglarka@agrar.mta.hu, Muller.Tamas@mkk.szie.hu

Összefoglalás

A szerzők jelen tanulmányukban a hazai angolna indukált szaporítási kísérletek során nyert ikrákon megtelepedő baktériumos fertőzések felmérését és a védekezési lehetőségek feltérképezését tűzték ki célul. A mikrobiológiai vizsgálatok során egyetlen uralkodó faj, a *V. cyclitrophicus* került izolálásra. Megjelenése a kísérleti rendszerben, a mesterséges tengervíz előállításához használatos tengeri só fertőzőöttségének lehet az eredménye. Az antibiotikum érzékenységi tesztek alapján, zárt rendszerekben a súlyos kimenetelű vibriózis hatékony megelőzésére flórfenikol kezelés, és az általános sterilitás fenntartása érdekében, gyakori hígított formalinos átmosás ajánlott.

Summary

The global warming; the overfishing of the sexually mature adult fish (the spawners) and the offspring; the environmental pollution and parasites have significant impact of severe decline in the European eel (*Anguilla anguilla*) stock. For restocking purposes, several research projects about the elaboration of captive breeding methods and hatchery technology of eel, have been initiated. The detection of piscine pathogens and the development of effective therapeutic and prevention strategies against their infections during the early life stages in fish (eggs, larvae, fry, and smolts) under controlled conditions are essential for successful work.

The aim of the present study was to identify the pathogen(s), and to make propose for the possible treatments against the infection of the developing eel embryos, that produced by the controlled reproduction process following hormone-induced sexual maturation of female European eel.

The pathogenic bacteria were isolated on different selective media. They were characterised by morphological -, microscopic examinations and with some biochemical tests. Their taxonomic status was verified by using the Biolog MicroStation ID system, and by amplification and sequencing of the 16S rDNA genome region. Then their antimicrobial sensitivity was checked by Kirby-Bauer disc diffusion method using 10 various antibiotics (ampicillin, chloramphenicol, cotrimoxazole, enrofloxacin , erythromycin, florfenikol, furazolidone, gentamicin, oxytetracycline, polymyxin-B).

The phenotypic and genotypic microbiological assays detected the presence of only one dominant species; that was the *Vibrio cyclitrophicus*, a member of *Vibrio splendidus* clade. The pathogenicity of these bacteria to larvae of molluscs and shrimps has been already known. Their emergence in the closed experimental system may be the result of the artificial sea water prepared from contaminated sea salt. Based on the antibiogram of the isolated

bacterium strain the use of chloramphenicol has been suggested for prevention, but a consequent formalin treatment of the water for general disinfection is also necessary.

Irodalmi áttekintés

Az európai angolna (*Anguilla anguilla*) a katadrom típusú halak csoportjába tartozik, ami azt jelenti, hogy egy hosszantartó édesvízi életciklust (3-40 év) követően a tengerbe vándorol szaporodni (Sargasso tenger, Atlanti óceán). A lebegő ikrából kikelő lárvák a Golf – és az Észak-Atlanti áramlat segítségével jutnak el az európai partvidékig, onnan a folyókba vándorolva kezdik meg édesvízi életciklusukat. Az európai angolnának az északi félteke felmelegedésével szembeni érzékenysége, de a Golf-áramlat 20 000 év előtti erejének és pozíciójának változása is aggodalomra ad okot. Ezen túl, rövid idejű hatások, mint például az ivadék árának villámgyors emelkedése; az ivadék - és az ívóhelyre vándorló felnőtt egyedek túlhalászata; környezetszennyezési problémák; valamint elhullást okozó parazitózisok (mint például a balatoni 1991-es angolna-pusztulásában is fő szerepet játszó *Anguillicoides crassus* úszóhólyagparazita (2,11) mind negatívan hatnak az angolnapopuláció méretére. Az „Egyezmény a Veszélyeztetett Vadon Élő Állat- és Növényfajok Nemzetközi Kereskedelméről” (Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora, CITES) a II. kategóriába sorolja az európai angolnát, azaz nem fenyegeti a kihalás közvetlen veszélye, de befogásukra és kereskedésükre súlyos korlátozások vonatkoznak (7). Állományuk növelésére több programot indítottak, melynek egyik eleme a fogságban történő indukált ivarérlelésük és szaporításuk. Az angolna tenyésztéséről a szó eredeti értelmében nem beszélhetünk, mivel még senkinek nem sikerült indukált szaporítás után felnevelni egyetlen európai angolnalárvát sem. Az összes, Európában található angolna természetes ívásból származik! Az egyik fontos megoldandó probléma a kontrollált körülmények között nevelt embrió-, majd a lárvagenezis során fellépő ikra- és lárvakárosodások felismerése és az ellenük való védekezés kimunkálása. Az ilyen irányú kezdeményezések közül említendő Sørensen és mtsai. (14) munkája, akik foglalkoztak az angolna indukált ivarérlelése és

szaporítása nyomán nyert ikratételek inkubációja során fellépő mikrobiális fertőzésekkel, és próbálkoztak azok kezelésével (antibiotikum mixek és fertőtlenítőszer), azonban a kísérleti állapotok eltértek az általunk biztosított körülményektől, valamint nem végeztek baktérium meghatározást.

Munkánk során célul tűztük ki a hazai angolna indukált szaporítási kísérletek során nyert termékenyített és fejlődő embriót tartalmazó ikráin megtelepedő baktériumos ártalmak felmérését, valamint az ellenük való védekezési lehetőségek kidolgozását.

Anyag és Módszer

A Balatonból származó angolna ikrásokat indukált ivarérelési kísérletbe vontunk ($n=6$, átlag testtömeg $741,5 \pm 154,1$ g), melynek során egy halat sikerült ovuláció előtti állapotig felkészíteni (a Horváth és mtsai. által módosított protokoll alapján (6)). Ezt a halat egy előre felkészített ívató kádban ($1580 \times 2100 \times 51$ mm $1,49$ m³ hasznos víztömeg, mesterséges tengervíz ((Aqua Medic Meersalt), sókoncentráció 35‰), $2\mu\text{g}$ 17alpha, 20beta-dihydroxy-4-pregnen-3-one (Sigma Aldrich) / testtömeg kg kezeléssel (a Müller és mtsai. által módosított protokoll alapján (12)) sikerült 3 hasonló módon felkészített tejjel ívásra bírni. Az utolsó kezelést követő 14 óra 45 percben az ikrás a három hímmelel leívták. Ezt követően a kádból a halakat kiemeltük, és a termékenyült ikraszemeket a kádban keltettük (18°C). A termékenyítést követő 38. órában a termékenyült és fejlődő embriót tartalmazó ikraszemeket ($n=20$, gerinchúros állapot, **1. ábra**) a Magyar Tudományos Akadémia Állatorvos-tudományi Intézetébe szállítottunk tartóvizükkel, ahol mikrobiológiai vizsgálatokra került sor.

Két-két ikraszemet homogenizáltunk $100\ \mu\text{l}$ mesterséges tengervízben, majd a széleskörű vizsgálatokhoz 5% defibrinált juhvérral kiegészített Trypticase Soy (TSA), Aeromonas, Phenylethyl Alcohol (PEA) (LabM, Lancashire, UK) és Cytophaga, Sabouraud agarra oltottuk a mintát. Az ikranevelési hőmérsékletnek megfelelően a táptalajokat 18°C -on inkubáltuk, a

baktériumnövekedést 24 és 48 óra elteltével ellenőriztük. A kitenyésztett baktérium alapvető sajátságait függőcsepp készítmény mikroszkópos vizsgálatával, valamint Gram-festéssel, kataláz-oxidáz próbával, valamint, a Biolog MicroStation ID system (Biolog, Ca) használatával GEN III Microplate™ lemezen jellemeztük. A törzs antimikrobiális szerekekkel szembeni érzékenységét juhvérrel kiegészített Müller-Hinton (MHA) táptalajon (LabM, Lancashire, UK) Kirby-Bauer korongdiffúziós módszerrel, az alábbi antibiotikumokkal szemben vizsgáltuk: ampicillin (10µg), klóramfenicol (30µg), cotrimoxazol (25µg), enrofloxacin (5µg), erytromicin (15µg), flórfenikol (30µg), furazolidon (20µg), gentamicin (10µg), oxytetraciklin (30µg), polymixin-B (300iu) (Abtek Biological Ltd., Liverpool, UK). A mintából Chelex-módszerrel (17) DNS-t vontunk ki molekuláris biológiai vizsgálatok céljára. A fajazonosítás érdekében elvégeztük a riboszómális 16S RNS gén univerzális 27F és 1512R primerekkel történő felszaporítását és szekvencia elemzését.

A statisztikai kiértékelést SPSS for Windows 10.0 programcsomag segítségével végeztük el. Az antibiotikum rezisztencia vizsgálat során mért gátlási mező átmérők adatait egytényezős varianciaanalízissel (one-way ANOVA, Tukey Post Hoc teszt) vetettük össze egymással 5%-os szignifikancia szinten.

Eredmények és megvitatásuk

A termékenyített – és fejlődő embriót tartalmazó angolna ikrákon megtelepedő baktériumok vizsgálata során egy uralkodó faj jelenlétét tudtuk igazolni.

A TSA agaron már 24 óra elteltével szintenyészetben megjelenő apró, kerek, konvex, ép szélű, krémszínű telepek natív mikroszkópos vizsgálata mozgó, enyhén hajlott pálcika alakú baktériumok jelenlétét mutatták. Az izolálásra került törzs Gram-festéssel negatívnak, a kataláz és oxidáz próbában pozitívnak bizonyult. A *Vibrio* fajokra szelektív TCBS (Thiosulphate Citrate Bile salts Sucrose) agarra oltva jellegzetes sárgán pigmentált telepeket

képzett (**2. ábra**). A szénforrás-hasznosításon alapuló Biolog rendszer *V. splendidus* fajként azonosított.

Végül, a törzs, 16S rDNS 1463bp hosszú szekvencia régió vizsgálata alapján *V. cyclitrophicus*-nak bizonyult. Ez a faj a *V. splendidus* klád tagja (10), melyen belül a szekvencia hasonlóság igen nagy (**3. ábra**). A csoport tagjainak osztrigára- (*Crassostrea* spp., *Ostrea edulis*), vénusz kagylóra (*Venerupis* spp.) és fésűkagylókra (*Pecten maximus*) való patogénitását már világszerte kimutatták (4, 15,16). A bakteriális nekrosis vagy lárvakori vibriózis néven ismert megbetegedésben a *Vibrio* fajok által termelt exotoxinok hemocitákra kifejtett citotoxikus hatásának tulajdonítanak elsődleges jelentőséget (9). A klád különböző tagjait, egyes tengeri halak (*Scophthalmus maximus*, *Hippoglossus hipoglossus*, *Gadus morhua*) ikra vagy lárva-stádiumában tapasztalt nagymértékű elhullásával is kapcsolatba hozták, de egyértelmű pathogénitásuk nem nyert bizonyítást (1, 3, 13).

Az eredményes kezelés érdekében az izolálásra került baktériumtörzs, általánosan használt antibiotikumok elleni érzékenységének vizsgálata során leginkább hatékonyak a: klóramfenikol, flórfenikol, enrofloxacin, oxitettraciklin, furazolidon, kevésbé hatékonyak a: cotrimoxazol, eritromicin, polimixin-B és a gentamicin bizonyult (**4. ábra**). A kapott adatok alapján mind az ikrakeltetéshez, mind a lárvaneveléshez a megbetegedést okozó *Vibrio* törzsek féken tartására a flórfenikol hatóanyag javasolt. Ez utóbbi készítmény alkalmazása a vibriózis megelőzésére a nemzetközi kagyló- és ráktenyésztésben hosszú ideje széleskörűen elfogadott (5, 8, 16).

A keltetés alatt az embrió életképességét csökkentő kórokozók (baktericid és bakteriosztatikus hatás) kártételének megakadályozása céljából a következő eljárást ajánljuk:

- 1.) Formalin oldatos kezelés (formaldehid 37%-os vizes oldatából 1:20.000 hígítás),
átmosás 24 óránként egy alkalommal.
- 2.) Flórfenikol 20 mg/L dózissal, 24 óránként 20 perc kezelés átfolyó rendszerben.

Köszönetnyilvánítás

A kutatást a Állattenyésztés Tudományok Fejlesztéséért Alapítvány, Mohamed bin Zayed Species Conservation Fund (project no. 12252178), valamint a Nemzeti Kiválóság Program (11476-3/2016/FEKUT) azonosító számú pályázatok támogatták.

Irodalomjegyzék

1. BERGH, O. - SKIFTESVIK, A.B. - RØDSETH, O.M.: Host specificity of *Vibrio* infections in marine fish larvae. International Symposium on Aquatic Animal Health, Seattle, WA (USA) 4-8 Sept (1994) University of California, School of Veterinary Medicine: Davis, CA (USA) W-5.2.
2. CSABA, G. – LÁNG, M. – SÁLYI, G. – RAMOTSA, J. – GLÁVITS, R. – RÁTZ, F.: Az *Anguillicola crassus* (Nematoda, Anguillicolidae) fonálféreg és szerepe az 1991. évi balatoni angolnapusztulásban. *Magy. Állatorv. Lapja*, 1993. 48. 11–21.
3. GATESOUPÉ, F.J. – LAMBERT, C. – NICOLAS, J.L.: Pathogenicity of *Vibrio splendidus* strains associated with turbot larvae, *Scophthalmus maximus*. *J. Appl. Microbiol.*, 1999. 87. 757–763.
4. GAY, M. - BERTHE, F.C.J. - LE ROUX, F.: Screening of *Vibrio* isolates to develop an experimental infection model in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Dis. Aquat. Org.*, 2004.59. 49–56.
5. GÓMEZ-LEÓN, J. - VILLAMIL, L. ET AL.: Isolation of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio splendidus* from aquacultured Carpet Shell Clam (*Ruditapes decussatus*) larvae associated with mass mortalities. *J. Appl. Microbiol.*, 2005. 71(1). 98–104.
6. HORVÁTH, L. – SZÉKELY, CS. – BOCZONÁDI, ZS. – BERCSÉNYI, M. – URBÁNYI, B. – MÜLLER, T.: Induced oogenesis of the European eel (*Anguilla anguilla* L.) in freshwater condition. *Acta Biol. Hung.*, 2011. 62(4). 485–488.
7. KOLICS, B. – KOVÁCS, B. – TALLER, J. – VÁRKONYI, L. – HORVÁTH, L. – KUCHARCZYK, D. – MÜLLER, T.: Az európai angolna ivadék fajmeghatározása PCR-RFLP módszerrel. *Magy. Állatorv. Lapja*, 2015. 137. 411–414.

8. KRISHNIKA A. - RAMASAMY P.: Antimicrobial resistance profile of *Vibrio* species isolated from the hatchery system of *Macrobrachium rosenbergii* (Deman). *Indian J. Fish.*, 2013. 60(4). 147-152.
9. LANE, E. – BIRKBECK, T.H.: Species specificity of some bacterial pathogens of bivalve molluscs is correlated with their interaction with bivalve haemocytes. *J. Fish Dis.*, 2000. 23. 275–279.
10. LASA, A. - DIÉGUEZ, A.L. – ROMALDE, J.L.: *Vibrio toranzoniae* sp. nov., a new member of the Splendidus clade in the genus *Vibrio*. *Syst. Appl. Microbiol.*, 2013. 36. 96– 100.
11. MOLNÁR, K.- BASKA, F. - CSABA, GY. - GLÁVITS, R. - SZÉKELY, CS.: Pathological and histopathological studies of the swimbladder of eels (*Anguilla anguilla*) infected by *Anguillicola crassus* (Nematoda:Dracunculoidea). *Dis. Aquat. Org.*, 1993. 15: 41-50.
12. MÜLLER, T. – BASKA, F. – VÁRADI, B. – HORN, P. – BERCSÉNYI, M.: Testis histology in artificially matured European eel (*Anguilla anguilla* L.) at the end of sexual maturation and spermatozoa ultrastructure in freshwater rearing. *Acta Biol. Hung.*, 2005. 56 (1). 169–172.
13. REID, H.I. – TREASURER, J.W. ET AL.: Analysis of bacterial populations in the gut of developing cod larvae and identification of *Vibrio logei*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio splendidus* as pathogens of cod larvae. *Aquaculture*, 2009. 288. 36–43.
14. SØRENSEN, S.R. – SKOV P.V. ET AL. Microbial interference and potential control in culture of European eel (*Anguilla anguilla*) embryos and larvae. *Aquaculture*, 2014. 426-427. 1-8.
15. SUGUMAR, G. – NAKAI, T. ET AL.: *Vibrio splendidus* biovar II as the causative agent of bacillary necrosis of Japanese oyster *Crassostrea gigas* larvae. *Dis. Aquat. Organ.*, 1998. 33(2). 111-118.

16. TORKILDSEN, L. – LAMBERT, C. ET AL.: Bacteria associated with early life stages of the great scallop, *Pecten maximus*: impact on larval survival. *Aquacult. Int.*, 2005. 13. 575-592.
17. WALSH, P.S. - METZGER, D.A. - HIGUCHI, R.: Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques*, 1991. 10. 506- 513.

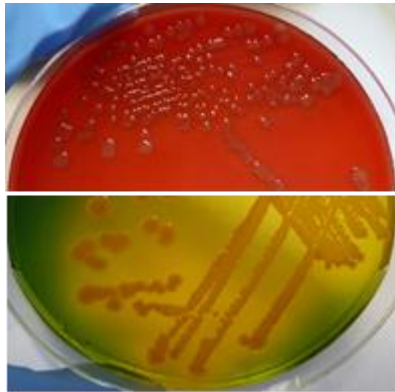
1.ábra. *Gerinchúros angolna embrió.* A szik központjában lévő olajcsepp biztosítja az ikra lebegését

Figure 1. *Eel embryo.* The oil drop in the center of the yolk provides the buoyancy



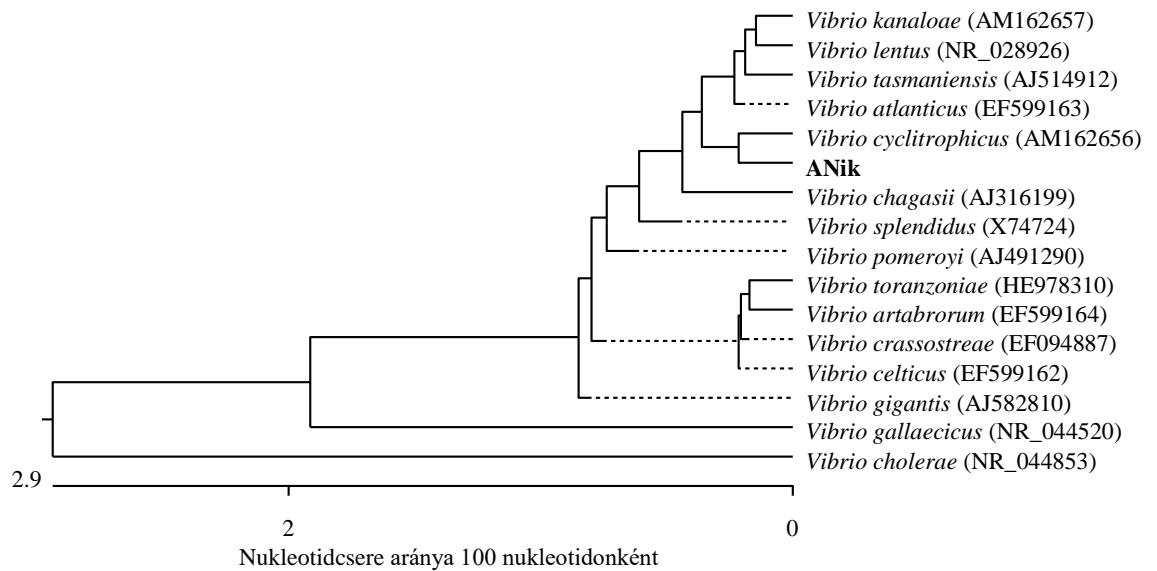
2.ábra. Az angolna ikra mikrobiológiai vizsgálatában izolálásra került baktérium tenyésztete juhvérrel kiegészített TSA és szelektív TCBS agaron

Figure 2. Cultivation of the strain isolated from eel embryos on TSA (Tryptic Soya agar) supplemented with sheep blood and on the selective TCBS (Thiosulphate Citrate Bile salts Sucrose Agar)



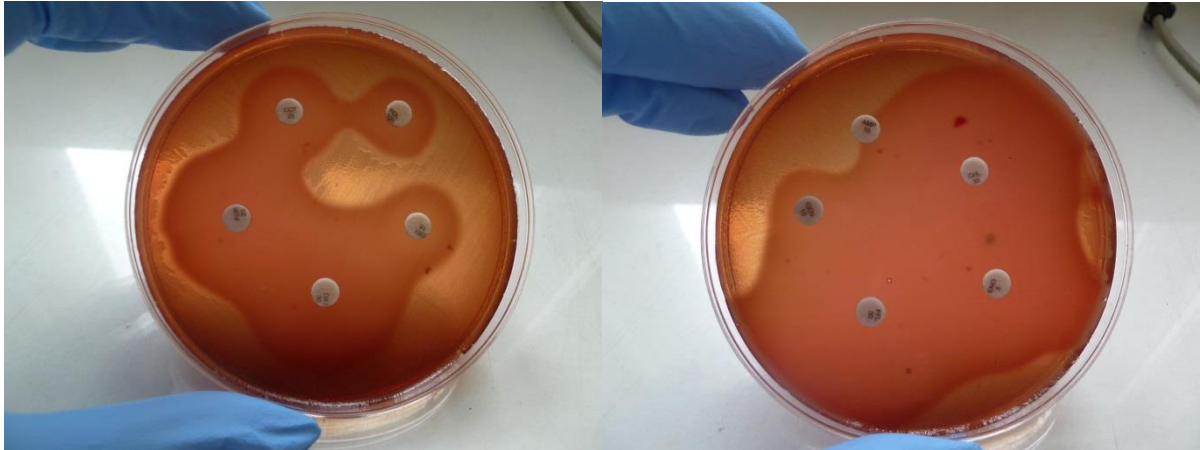
3.ábra. Az angolna ikra mintából izolált törzs (ANik) filogenetikai helyzete a *Vibrio splendidus* kládon belül a 16S rDNS 1463bp hosszú szakaszon végzett szekvenciaelemzésnek megfelelően (DNASTAR Lasergene 7 Software CLUSTAL W multiple alignment algorithm)

Figure 3. The phylogenetic status of studied bacterial strains (ANik) within the *Vibrio splendidus* clade (14 species) based on sequence analysis of 16S rDNA (1463bp). The tree was constructed with the DNASTAR Lasergene 7 Software, using the CLUSTAL W multiple alignment algorithm.



4. ábra. Az angolna ikra mintából izolált *Vibrio* törzs antibiotikum érzékenységének vizsgálata korongdiffúziós módszerrel juh vérrel kiegészített Müller-Hinton agaron.

Figure 4. Antimicrobial susceptibility testing of *Vibrio* sp. isolated from eel embryos by the Kirby-Bauer disc diffusion method on Müller-Hinton agar supplemented with sheep blood



1.táblázat. Az angolna ikra bakteriális vizsgálata során izolált *Vibrio* sp. rezisztencia vizsgálatok eredményei (a különböző betűjelek a statisztikailag igazolható különbségeket jelölnék $p < 0,05$ szinten)

Table 1. Zone of antimicrobial drugs' inhibition (in mm) against *Vibrio* sp. isolated from eel embryos (The different characters show the statistically certifiable difference on the level $p < 0.05$)

Antibiotikum	Antibiotikum gátlási mezők mm-ben ($\text{átlag} \pm \text{szórás}$)
Cotrimoxazol	22,5 \pm 0,6 d
Eritromicin	19,5 \pm 0,9 e
Furazolidon	35,9 \pm 0,4 c
Oxitetraciklin	39,4 \pm 1,2 b
Polimixin-B	18,0 \pm 1,1 ef
Ampicillin	6,0 \pm 0,0 g
Gentamicin	16,0 \pm 0,5 f
Flórfenikol	50,6 \pm 0,7 a
Klóramfenikol	49,0 \pm 1,9 a
Enrofloxacin	39,7 \pm 1,5 b